



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

«مدیریت پژوهشی»

عنوان طرح پژوهشی:

«تاثیر عصاره گیاهی شکرشفا در درمان دیابت نوع-۱ در مدل موش

های صحرایی (Rats)»

مجری طرح :

دکتر صمد اکبرزاده\_دکتر پرویز بزی

همکاران طرح :

دکتر افشار بارگاهی\_عادل دانشی

سال ۱۳۸۹

## مقدمه:

شیوع بیماری دیابت در جهان به حدود ۳۰ میلیون نفر بالغ می‌شود که در حال حاضر بیش از ۵/۵ میلیون نفر از جمعیت ایران به بیماری دیابت مبتلا هستند. استان‌های یزد، بوشهر، قزوین و تهران از جمله استان‌هایی هستند که تعداد بیماران دیابتی در آنها زیاد است. به دلیل افزایش روز افزون بیماران دیابتی در ایران، تحقیقات پایه در زمینه دیابت جزئی جدایی ناپذیر از پژوهش‌های حوزه سلامت در دانشگاه‌ها و موسسات علمی کشور می‌باشد.

با توجه به عوارض جانبی کم‌تر داروهای گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی و نیز تجارب رضایت بخش استفاده از آنها در ابعاد کمی و کیفی کنترل و درمان بیماری دیابت، تحقیقات مختلفی در زمینه تاثیرات درمانی داروهای گیاهی بر بیماری دیابت انجام شده که بسیاری از آنها با موفقیت همراه بوده است. در تحقیق کنونی تاثیر عصاره شکرشفا بر میزان گلوکز هورمون انسولین، تری گلیسیرید، کلسترول و تغییرات بافتی پانکراس مورد بررسی قرار گرفت تا با نگاهی نو به ویژگی این گیاه دارویی سنتی در خصوص کاهش قند خون، درپچه دیگری به سوی فواید گیاه درمانی و کنترل بیماری دیابت باز شود. در این پروژه سعی بر این بوده تمام جوانب تاثیر گذاری گیاه بر فاکتورهای مرتبط با بیماری دیابت در نظر گرفته شود تا تاثیرات این گیاه بر روند بیماری با اطمینان بیشتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. به همین دلیل ۲ نکته مهم مد نظر قرار گرفت:

۱. بدست آوردن داده‌های آماری از منابع مختلف اعم از شاخصهای بافتی، هورمونی و بیوشیمیایی

۲. ایجاد دیابت متوسط (moderate) به جای دیابت شدید در موش‌های صحرایی

بررسی تغییرات بافتی نقش بهینه در تکمیل آنالیز تاثیرات درمانی گیاه بر روند بیماری دیابت دارد و با ایجاد دیابت متوسط می‌توان روند درمانی عصاره گیاهی را با دیدی موجه‌تر و کامل‌تر بررسی کرد. اما این طرح همانند بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی مشکلات خاص خود را در پی داشت. همچنین به علت در نظر گرفتن دو نکته فوق‌الذکر، این پروژه نسبت به طرحهای مشابهی که در کشور انجام شده دارای حجم کار بیشتری بود. پاره‌ای از مشکلاتی که در تحقیق کنونی به وجود آمد شامل موارد ذیل بود:

الف) یافتن دوزی از داروی استرپتوزوسین که به جای دیابت شدید (قند ناشتا بالای  $300 \text{ mg/dL}$ ) دیابت متوسط (قند ناشتا بین  $150 \text{ mg/dL}$  تا  $300 \text{ mg/dL}$ ) ایجاد کند.

بسیاری از دوزهای پایین دارو دیابت ایجاد نمی‌کردند و دوزهای معمول (۶۵ تا ۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) دارو نیز غالباً دیابت شدید ایجاد می‌کردند. بنابراین عملاً سعی شد دوزی انتخاب شود که در اکثر حیوانات دیابت متوسط ایجاد کند زیرا با وجود اینکه داروی استرپتوزوسین به صورت وابسته به وزن تزریق گردید اما لزوماً پاسخ همه حیوانات به دارو یکسان نبود. به عبارت دیگر دارو در یک حیوان ممکن بود دیابت شدید ایجاد کند اما در حیوان دیگر دیابت متوسط. البته این امر طبیعی است زیرا ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیک هر حیوان با حیوان دیگر متفاوت است.

ب) گاوآذ دهانی عصاره گیاهی شکر شفا به موش‌های صحرایی

مزه بسیار تلخ عصاره شکرشفا موجب می شد حیوانات دارو را فرو نبرند به همین دلیل گاواژ دهانی با استفاده از نیدل های بلند انجام شد تا از رسیدن عصاره به دستگاه گوارش اطمینان حاصل شود.

ج) نگهداری حیوانات دیابتی

موشهای صحرایی دیابتی زیاد آب میخورند و میزان ادرار آنها نیز بیشتر از موشهای سالم است. به همین دلیل تمیز کردن مکرر قفس ها و بررسی دائم تغذیه آنها امری الزامی است به ویژه ضعیف بودن موشهای صحرایی دیابتی مراقبت بسیار بالاتری را ملزم می دارد.

د) بیهوشی حیوانات با اتر

موشهای صحرایی دیابتی در مقایسه با موشهای صحرایی سالم مقاومت کمی نسبت به بیهوشی دارند، به همین دلیل کوچکترین غفلت از آنها در هنگام بیهوشی با پنبه آغشته به اتر در زمان خونگیری منجر به قطع تنفس و در نتیجه مرگ آنها می شود.

با تمام این مشکلات، طرح با موفقیت به اتمام رسید و نتایج حاصله روند درمانی عصاره شکرشفا را به خوبی نشان دادند. آنالیز شیمیایی ترکیبات عصاره و جداسازی مواد موثر آن با استفاده از روش های آزمایشگاهی نظیر کروماتوگرافی تحت فشار بالا (HPLC) می تواند گامی موثر جهت ساخت داروهای کنترل دیابت نوع ۱ با عوارض جانبی کمتر باشد. در مجموع با توجه به نتایج این تحقیق و طرحهای پژوهشی مشابه، لزوم انجام پروژه های تحقیقاتی دیگری در راستای تکمیل اهداف این طرح و به مرحله اجرا رسانیدن آن محسوس است. به امید آنکه بررسیهای صورت گرفته در این پژوهش بتواند ابعاد وسیع تری از خواص درمانی گیاه شکرشفا و جنبه های درمانی و کنترلی بیماری دیابت را نمایان سازد.

## سپاسگزاری

مجریان و همکاران طرح مراتب تشکر و قدردان ی را از مسئولان محترم سازمان جهاد کشاورزی استان بوشهر، پارک علم و فن آوری و دیگر دست اندرکاران دانشگاه عوم پزشکی استان بوشهر اعلام می دار.

## فهرست

۱. مقدمه.....
۲. روش کار.....
۳. نتایج.....
۴. نتیجه گیری.....
۵. منابع.....

## جداول

جدول ۱..... میانگین غلظت سرمی گلوکز ناشتا (mg/dL) در گروه های مختلف در روزهای قبل و بعد از تزریق استرپتوزوسین

جدول ۲..... میانگین غلظت سرمی انسولین ناشتا (U/L) در گروههای مختلف در روزهای مختلف پس از تزریق استرپتوزوسین

جدول ۳..... مقادیر HOMA.B و HOMA.IR در گروههای مختلف در روزهای مختلف پس از تزریق استرپتوزوسین

جدول ۴..... مقادیر سرمی کلسترول (mg/dL) در گروههای مختلف در روزهای مختلف پس از تزریق استرپتوزوسین

جدول ۵..... مقادیر سرمی کلسترول HDL (mg/dL) در گروههای مختلف در روزهای مختلف پس از تزریق

استرپتوزوسین

جدول ۶..... میانگین مقادیر سرمی تری گلیسیرید ناشتا (mg/dL) در گروههای مختلف در روزهای مختلف پس از تزریق

استرپتوزوسین

## نمودارها

نمودار ۱..... میانگین غلظت سرمی گلوکز ناشتا (mg/dL) در گروه های مختلف در روزهای قبل و بعد از تزریق

استرپتوزوسین

نمودار ۲..... میانگین مقادیر سرمی تری گلیسیرید ناشتا (mg/dL) در گروههای مختلف در روزهای مختلف پس از تزریق

استرپتوزوسین

## تصاویر

شکل ۱..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه کنترل مثبت ( فاقد دریافت STZ و دارو)

شکل ۲..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه کنترل مثبت ( فاقد دریافت STZ و دارو)

شکل ۳..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار منفی (دریافت STZ و عدم تیمار با دارو)

شکل ۴..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار منفی (دریافت STZ و عدم تیمار با دارو)

شکل ۵..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار (دریافت دوز صد دارو)

شکل ۶..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار مثبت (دریافت دوز صد دارو)

شکل ۷..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار مثبت (دریافت دوز دویست دارو)

شکل ۸..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار مثبت (دریافت دوز دویست دارو)

شکل ۹..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار مثبت (دریافت دوز چهارصد دارو)

شکل ۱۰..... فتومیکروگراف، مقطعی از بافت پانکراس گروه تیمار مثبت (دریافت دوز چهارصد دارو).

## چکیده

**مقدمه:** با توجه به هزینه های بالای دارو درمانی، عوارض جانبی داروهای صنعتی، عدم بهبودی کامل بیماران دیابتی تحت درمان داروهای شیمیایی و نیز تجارب موفقیت آمیز گیاه درمانی، توجه محققین به استفاده از داروهای گیاهی جلب شده است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی تاثیر هایپوگلیسمیک عصاره الکلی گیاه شکر شفا (*Otostegia persica*) در موش های صحرایی سالم و دیابتی شده با استرپتوزوسین می باشد.

**روش بررسی:** داروی استرپتوزوسین با دوز ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به رت های بالغ تزریق گردید. بعد از ۶ روز رت هایی که گلوکز ناشتای آن ها بالای ۱۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. حیوانات به ۵ گروه تقسیم شده و گروه های تیمار عصاره را به ترتیب در مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت دهانی و به مدت سی روز دریافت داشت تند. از همه گروهها در روزهای دهم، بیستم و سی ام جهت سنجش میزان گلوکز و انسولین ناشتا خونگیری به عمل آمد. از نمونه های سرمی حاصل از خونگیری در روز آخر جهت اندازه گیری پارامترهای دیگر شامل غلظت سرمی تری گلیسیرید، کلسترول تام و HDL تهیه گردید. اسلایدهای بافتی از طریق میکروسکوپ نوری جهت تخمین تغییرات هیستولوژیک لوزالمعده مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** میانگین سطح سرمی گلوکز ناشتا ( $p < 0.05$ ) در روز دهم فقط در گروه تیمار با مقدار ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی نشان داد اما در روزهای بیستم و سی ام گلوکز ناشتا در همه گروههای تیمار کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان داد. همچنین مقادیر سرمی تری گلیسیرید (mg/dL) سرمی ناشتا در گروه های تیمار با مقادیر مختلف عصاره کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان داد. مقادیر سرمی انسولین، HOMA.B، HOMA.IR، کلسترول و کلسترول HDL در همه گروهها تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت. بررسیهای بافتی نیز تخریب سلولهای بتای پانکراس در گروههای کنترل دیابتی و گروه های تیمار نشان داد. اما میزان تخریب سلولهای آلفا در گروههای تیمار کمتر از گروه کنترل دیابتی بود بطوریکه در گروه دیابتی تیمار با دوز ۴۰۰ میلی گرم عصاره میزان استحاله استوما و توده سلولی به حداقل رسید.

**نتیجه گیری:** عصاره گیاه شکر شفا موجب کاهش گلوکز و تری گلیسیرید خون در رت های مبتلا به دیابت نوع ۱ می شود. همچنین تخریب سلولهای بتای پانکراس در رت های دیابتی را کاهش میدهد.

**واژگان کلیدی:** شکر شفا، دیابت نوع ۱، گلوکز، انسولین، کلسترول، تری گلیسیرید، پانکراس، موش صحرایی

## مقدمه:

دیابت قندی یک اختلال مزمن در متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و چربی است که به علت نقص مطلق یا نسبی در ترشح انسولین به علت اختلال عملکرد سلولهای بتای پانکراس (دیابت شیرین نوع ۱) یا کاهش حساسیت بافتهای هدف نسبت به تاثیرات انسولین (دیابت شیرین نوع ۲) ایجاد می شود (۱،۲). هایپرگلیسمی ناشی از دیابت باعث ایجاد بیماری های ریزعروقی (Microvascular) مانند رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی و بیماری های بزرگ عروقی (Macrovascular) نظیر بیماریهای قلبی -عروقی می شود (۲). با توجه به هزینه های بالای دارودرمانی و عوارض جانبی داروهای صناعی و همچنین عدم بهبودی کامل بیماران دیابتی تحت درمان داروهای شیمیایی، توجه محققین به سوی استفاده از داروهای گیاهی جلب شده است (۳). داروهای گیاهی عوارض جانبی ناچیزی در مقایسه با داروهای شیمیایی دارند. درمان دیابت شیرین با استفاده از داروهای گیاهی در تمام ج هان با موفقیت همراه بوده و در حال حاضر تمایل بیماران دیابتی به گیاه درمانی رو به افزایش است (۱). گیاه شکرشفا (*Otostegia persica*) از تیره نعنا در جنوب و جنوب شرقی ایران می روید. عصاره ی آبی بخش های هوایی شکرشفا دارای خواص آنتی هیستامینی، ضد اسپاسم و ضد آرتريت است (۴). نشان داده شده است که عصاره ی متانولی شکرشفا دارای خاصیت آنتی اکسیدانی معادل چای سبز است و ترکیباتی به نام مورین و کورستین در آن دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشند (۵). با توجه به استفاده از شکرشفا در درمان سنتی دیابت و نیز خواص آنتی اکسیدانی آن که می تواند در کاهش تاثیر پاتوژنی پراکسیدهای لیپیدی ایجاد کننده دیابت و در نتیجه کنترل این بیماری و بهبود عوارض آن موثر باشد در تحقیق کنونی سعی بر این است اثر عصاره گیاهی شکرشفا بو میزان قند ناشتای خون، مقاومت انسولینی (*HOMA.IR*)، عملکرد سلول های بتای پانکراس (*HOMA.B*)، کلسترول تام، *HDL*، تری گلیسیرید و نیز تغییرات بافتی پانکراس مورد بررسی قرار می گیرد. در صورت حصول نتایج مثبت، این گیاه می تواند بعنوان منبع طبیعی و فراوانی جهت طراحی نوعی دارو جهت درمان دیابت نوع-۱ محسوب گردد.

## مروری بر مطالعات قبلی :

در طب سنتی از گیاه گلدر (شکرشفا) جهت درمان مالاریا، دیابت و کاهش تب استفاده می شود. عصاره بخش های هوایی این گیاه به علت دارا بودن فلاونوئیدهای فراوان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی معادل عصاره متانولی چای سبز و *Ginkgo biloba* هستند و عصاره آبی - الکلی گلدر در سندرم عقب کشی مورفینی در موش سوری موثر است. همچنین عصاره متانولی اندام های هوایی گلدر برای فعالیت مثبت در تست مرگ و میر میگوی آب شور می باشد. تحقیقات دیگر نشان داده است عصاره گیاه گلدر تاثیر ضد باکتریایی بالقوه بر طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می باشد. علاوه بر این تحقیقات اخیر تاثیرات ضد اسپاسمی، آنتی هیستامینی و آنتی آرتريتی گلدر را به اثبات رسانده اند.

## مواد و روش‌ها :

موش های صحرایی با وزن تقریبی ۲۴۰-۱۸۰ گرم به ۵ گروه تقسیم می شوند. غلظت سرمی گلوکز همه آنها در حالت غیرناشتا کمتر از ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر است. حیوانات گروه اول هیچ نوع ماده ای دریافت نمی کنند و بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته می شوند. به همه حیوانات گروه های دیگر داروی استرپتوزوسین به صورت درون صفاقی با دوز ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ( با حجم تزریق وابسته به وزن بدن ) به منظور ایجاد دیابت نوع-۱ تزریق گردید. ۶روز پس از تزریق دارو، حیواناتی که قند ناشای سرمی آنها بالاتر از ۱۵۰ میلی گرم بردسی لیتر بود به عنوان دیابتی مفروض شدند. موشهای آزمایشگاهی گروه دوم به عنوان کنترل دیابتی در نظر گرفته شدند و جز آب و غذا هیچ ماده ای دریافت نکردند. حیوانات گروه های سوم، چهارم و پنجم عصاره گیاه شکرشفا را به ترتیب با مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت دهانی به مدت سی روز دریافت داشتند. در ده روز اول، دوم و سوم از همه حیوانات از طریق دم جهت اندازه گیری میزان گلوکز و انسولین ناشتا خونگیری به عمل آمد و در روز سی ام همه موشهای صحرایی با استفاده از اتر بیهوش و بافتهای پانکراس، کبد و کلیه آنها خارج و جهت آماده سازی لامه ای بافتی در فرمالین نگه داری شدند. در روز سی ام از قلب و دم حیوانات که به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در وضعیت ناشتا بودند خونگیری به عمل آمد و نمونه های خونی بلافاصله سانتیفریوژ، سرم همه آنها جدا و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی نظری گلوکز، انسولین، تری گلیسیرید، کلسترول تام و HDL کلسترول توسط دستگاه اتوآنالیزر selectra2 (vital science, spankeren, the Netherlands) انجام گردید. گلوکز به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز، کلسترول و HDL کلسترول به روش آنزیمی کلسترول اکسیداز و تری گلیسیرید به روش گلیسرول فسفات اکسیداز اندازه گیری شد. انسولین به روش ELISA (D&G Insulin ELISA kit) مورد اندازه گیری قرار گرفت. برای محاسبه مقاومت انسولینی (HOMA.IR) غلظت گلوکز هر نمونه سرمی (Mmol/l) در غلظت انسولین همان نمونه (U/L) ضرب گردید و عدد حاصل بر ۲۲.۵ تقسیم شد. همچنین برای محاسبه عملکرد سلول های بتای پانکراس (HOMA.B)، غلظت انسولین هر نمونه سرمی (U/L) بر ۳.۵ Glu- (غلظت گلوکز (Mmol/l) منهای ۳.۵) تقسیم و نتیجه حاصل در ۲۰ ضرب گردید. اسلایدهای بافتی از طریق میکروسکوپ نوری جهت تخمین تغییرات هیستولوژیک کبد، کلیه و لوزالمعده و شمارش تعداد سلولهای بتای پانکراس مورد بررسی قرار گرفتند. داده های حاصل از اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم و شاخص های بافتی اندامهای فوق الذکر در هر گروه به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان گردید و برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و روش آنالیز واریانس (ANOVA) و تست های Duncan، TUKEY و LSD استفاده و سطح معنی دار کوچکتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد ( $p < 0.05$ ).